

УДК 631.461:631.458

**ВЛИЯНИЕ ИНОКУЛЯЦИИ СЕМЯН РИЗОЦЕНОЗНЫМИ
АССОЦИАЦИЯМИ НА УРОЖАЙ И КАЧЕСТВО ЗЕРНА
ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ НА ПОЧВЕ
С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ КАДМИЯ**

Т.М. КАЗАРОВА, Н.К. СИДОРЕНКОВА, В.Ф. ВОЛОБУЕВА, В.К. ШИЛЬНИКОВА

(Кафедра микробиологии, кафедра агрохимии РГАУ — МСХА
имени КА. Тимирязева)

Приведены результаты изучения влияния инокуляции семян ризоценозными ассоциациями дикорастущей тропической культуры *Sesbania sp.* на урожай и качество зерна яровой пшеницы на почве с повышенным содержанием кадмия. В условиях вегетационных опытов выявлена способность бактериальных ассоциаций снижать фитотоксичность металла при их интродукции в ризосферу.

Ключевые слова: бактериальные ассоциации, инокуляция, кадмий, яровая пшеница.

Проблема биологической фиксации атмосферного азота — одна из важнейших в с.-х. биологии. Успехи в раскрытии молекулярных, биохимических и физиологических механизмов азотфиксации позволяют наряду с традиционными исследованиями по симбиотической азотфиксации использовать также возможность обеспечения небобовых культур азотом за счет его фиксации из атмосферы. С этой целью в агробиотехнологии особенно перспективно применение не одновидовых популяций (чистых культур) микроорганизмов, а их ассоциаций или консорциумов [5, 10, 15, 24, 25], которые по сравнению с чистыми культурами характеризуются повышенной эффективностью и стабильностью действия в отношении растения.

Полезное действие ассоциативных ризосферных бактерий на растения не ограничивается только увеличе-

нием доступного и экологически чистого азота. К их функциям относится также повышение доступности других элементов питания, в частности фосфора, стимуляция выработки растением фитогормонов, обеспечение защиты растений от фитопатогенов, стрессовых воздействий [4, 18, 21].

В последние годы появились сообщения [7, 23] о снижении фитотоксического действия тяжелых металлов на растения в присутствии ассоциативных ризосферных бактерий, испытывающих угнетение от действия ионов металлов и в связи с этимрабатывающих различные физиологические механизмы их детоксикации. Отсюда возникла необходимость наиболее полно выявить возможности ризоценозов с.-х. культур, которые бы обеспечивали в условиях загрязнения почвы тяжелыми металлами и биоконтроль, и максимальное проявление других положительных свойств

ризоценозных ассоциаций. Это тем более актуально, поскольку техногенное поступление химических элементов в окружающую среду носит не прекращающееся действие.

Методика

Исследования проводили в 2000—2001 гг. на кафедрах микробиологии и агрономической и биологической химии РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева. Объекты исследований — бактериальные ассоциации №6, 23 и 25 из коллекции культур бактерий, выделенных из ризоценозов дикого тропического растения *Sesbania sp.*

1. $N_1P_1K_1$ — Фон 1 (контроль)
2. Фон 1 + Cd₁
3. Фон 1 + Cd₂
7. $N_{1/3}P_1K_1$ — фон 3
8. Фон 3 + Cd₁
9. Фон 3 + Cd₂
13. Фон 3 + ассоциация № 6
14. Фон 3 + ассоциация № 6 + Cd₁
15. Фон 3 + ассоциация № 6 + Cd₂
19. Фон 3 + ассоциация № 23
20. Фон 3 + ассоциация № 23 + Cd₁
21. Фон 3 + ассоциация № 23 + Cd₂

Опыты проведены в вегетационном домике кафедры агрономической и биологической химии РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева. Опытная культура — яровая пшеница, сорт Иволга (почвенная культура, сосуды Митчерлиха).

Почва — дерново-подзолистая среднесуглинистая, содержание гумуса (по Тюрину) — 2,1%, pHсол — 5,7, Н_г — 1,4 мгЭКВ/100 г, S — 22,6, Т — 24 мгЭКВ/100 г, V — 94%, содержание подвижных форм (по Кирсанову) P₂O₅ — 87 мг/кг и K₂O — 295 мг/кг, содержание подвижного Cd (ААБ pH 4,8) — 0,06 мг/кг.

Азот, фосфор и калий по фону 1 вносили соответственно 0,15; 0,10; 0,07 г д.в./кг почвы (с учетом поправочного коэффициента по калию — 0,7); по фонам 2, 4 вносили полутор-

Семена и почва были привезены из Вьетнама (пойма реки Красная, почва аллювиальная, климат тропический). Ассоциации бактерий №6, 23 и 25 характеризуются высокой нитrogenазной активностью (до 73 нмоля C₂H₄/мл среды в сут.), стабильностью доминирования составляющих популяций (pp. *Pseudomonas* и *Bacillus*) и их соотношений в ассоциациях [22].

Влияние инокуляции семян бактериальными ассоциациями на урожай и качество зерна пшеницы на почве с повышенным содержанием Cd изучали в условиях вегетационных опытов по следующей схеме:

4. $N_1P_{1,5}K_1$ — Фон 2 (контроль)
5. Фон 2 + Cd₁
6. Фон 2 + Cd₂
10. $N_{1/3}P_{1,5}K_1$ — фон 4
11. Фон 4 + Cd₁
12. Фон 4 + Cd₂
16. Фон 4 + ассоциация № 6
17. Фон 4 + ассоциация № 6 + Cd₁
18. Фон 4 + ассоциация № 6 + Cd₂
22. Фон 4 + ассоциация № 23
23. Фон 4 + ассоциация № 23 + Cd₁
24. Фон 4 + ассоциация № 23 + Cd₂

Ную дозу фосфора. Для оценки роли инокуляции в схему опытов введены варианты без инокуляции с дозой азота 1/3 от полной (фон 3, 4). Азот вносили в форме NH₄NO₃, фосфор — Ca(H₂PO₄)₂ · H₂O, калий — KNO₃.

Кадмий вносили в 1-й год опытов в виде 3CdS₀₄ · 8H₂O с учетом ориентировочно-допустимых концентраций (ОДК, 1995) в зависимости от pH и гранулометрического состава почвы. Вносимые дозы составляли 1,0 и 2,0 мг/кг почвы. Влияние инокуляции семян бактериальными ассоциациями на аккумуляцию Cd в зерне пшеницы оценивали в сравнении с контрольными вариантами (фон 1, 2).

Закладку, посев, уход и учет урожая проводили по общепринятой методике. Норма высева — 25 семян на сосуд с учетом прореживания до

20 растений. Повторность опытов 4-кратная.

Семена обеззараживали (стерилизовали), замачивали в растворе нейтрального анонита с содержанием активного хлора 0,05%. Время экспозиции — 1ч. После обеззараживания семена прорачивали в термостате. Инокуляцию семян осуществляли двухсуточными культурами ризобактерий (титр 10^7 — 10^8 КОЕ/мл). Химические анализы почв и растений проводили согласно ГОСТам и по общепринятым методическим указаниям. Содержание Cd определяли в почве — в растворе ААБ с pH 4,8, в растительных образцах — после сухого озоления на атомно-адсорбционном спектрометре A AC PERKIN-ELMER 5100PC. О содержании сырого протеина судили по количеству общего азота в растениях, определенному методом Кельдаля.

Повторность всех аналитических работ 4-6-кратная. Математическая обработка данных проведена методом дисперсионного анализа с использованием программы Stars.

Результаты и их обсуждение

Кадмий относят к наиболее фитотоксичным элементам, влияющим прежде всего на урожайность с.-х. культур [11, 12, 19]. Существуют данные [17], что в малых дозах Cd стимулирует рост и развитие растений.

По другим данным [14], загрязнение почвы Cd, Zn, Pb и Си до 2 ПДК (ОДК) не влияет на урожай овса и овощных культур, но ухудшает качество корнеплодов: снижает содержание каротина, сахаров и клетчатки.

По результатам наших исследований, на формирование урожая зерна яровой пшеницы значительное влияние оказали инокуляция семян ассоциациями, дозы металла и уровень минерального питания растений (табл. 1). Урожай культуры в вариантах с инокуляцией находился на уровне контроля и выше в 1,3-1,5 раза вариантов без инокуляции с дозой азота 1/3 от полной. Максимальной величиной характеризовался вариант с ино-

Таблица 1

Урожай пшеницы при инокуляции семян бактериальными ассоциациями, г/сосуд

Вариант	Доза Cd, мг/кг почвы			Вариант	Доза Cd, мг/кг почвы		
	0	1,0	2,0		0	1,0	2,0
N ₁ P ₁ K ₁ — фон 1 (контроль)	19,3 19,8	17,2 18,6	16,5 18,0	N _{1,5} P _{1,5} K ₁ — фон 2 (контроль)	19,9 20,3	18,7 18,9	17,2 18,4
N _{1/3} P ₁ K ₁ — фон 3	14,7 14,9	13,4 13,9	12,8 13,2	N _{1/3} P _{1,5} K ₁ — фон 4	15,0 15,2	13,6 14,2	13,0 13,3
Фон 3 + ассоциация №6	19,6 19,9	17,9 19,1	17,0 18,2	Фон 4 + ассоциация №6	20,9 21,2	19,7 20,4	18,8 19,5
Фон 3 + ассоциация №23	21,4 21,9	20,2 21,3	19,1 20,7	Фон 4 + ассоциация №23	22,2 22,5	20,9 22,1	19,9 21,6
Фон 3 + ассоциация №25	19,9 20,1	18,8 19,7	18,1 19,3	Фон 4 + ассоциация №25	21,6 22,0	19,9 21,0	19,2 20,5
HCP_{05}^A 0,3/0,3		HCP_{05}^B 0,5/0,4		HCP_{05}^C 0,5/0,3			

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 в числителе — опыт 2000 г., в знаменателе — опыт 2001 г.; А — доза кадмия, В — доза фосфора, С — вариант инокуляции.

куляцией ассоциацией №23, прибавка урожая зерна пшеницы относительно контроля составила, в среднем, по обоим фонам 2,2 г/сосуд в 2000 г. и 2,1 г/сосуд в 2001 г.

Инокуляция семян ассоциациями также способствовала существенному снижению фитотоксичности Cd. При внесении Cd урожай снизился в зависимости от применяемых доз в контроле (без инокуляции) — на 10,9—14,5 и 6,0~13,6%, в вариантах с инокуляцией — в среднем на 6,6~11,0 и 6,5~10,5%.

При повышении уровня фосфорного питания растений токсичность металла несколько снизилась. С одной стороны, это можно объяснить положительным действием минерального фосфора на активность ризосферных микроорганизмов [3]. С другой стороны, тяжелые металлы в почве взаимодействуют с фосфатионами и в большинстве случаев их подвижность снижается вследствие образования труднорастворимых соединений [8, 21].

Во 2-й год при изучении последействия Cd отмеченные закономерности сохранились. Урожай зерна пшеницы был выше данного показателя в 1-й год. Следует отметить, что в 2001 г. сложились более благоприятные температурные условия в тече-

ние вегетации яровой пшеницы, что также сказалось на формировании урожая зерна. При анализе содержания сырого протеина установлено, что в опытах прямого действия и последействия Cd независимо от доз и уровня фосфорного питания растений качество зерна яровой пшеницы улучшалось (табл. 2). При этом общая тенденция сохранялась вплоть до высокой дозы металла. Возможно, это связано с защитными функциями растений — образованием специфического белка металлотионина, способного связывать поступающие в растения тяжелые металлы [6]. Подобная зависимость отмечена и в вариантах с ассоциациями № 6, 23 и 25. Накопление сырого протеина в вариантах с инокуляцией независимо от года выше аналогичных в контроле. В зависимости от доз Cd превышение составило в среднем по обоим фонам 0,7~0,9% в 2000 г. и 1,6—1,9% в 2001 г.

При повышенном содержании Cd в почве элемент по органам растения распределяется так же как и другие металлы: преимущественно в корнях, в наименьшей степени — в генеративных и запасающих органах [17, 20]. Выявлено наличие элеменстостатических барьеров на границах корни - стебель, стебель - зерно,

Таблица 2
Содержание сырого протеина в зерне пшеницы (% на абсолютно сухую массу)

Вариант	Доза Cd, мг/кг почвы			Вариант	Доза Cd, мг/кг почвы		
	0	1,0	2,0		0	1,0	2,0
N ₁ P ₁ K ₁ — фон 1 (контроль)	11,8 11,5	12,9 12,1	13,7 13,0	N ₁ P _{1,5} K ₁ — фон 2 (контроль)	12,7 12,0	13,3 12,6	13,7 13,2
N _{1/3} P ₁ K ₁ — фон 3	8,9 8,9	9,5 9,0	7,9 7,2	N _{1/3} P _{1,5} K ₁ — фон 4	9,7 9,5	10,4 9,9	9,6 9,3
Фон 3 + ассоциация №6	12,1 11,9	13,4 12,9	14,1 14,4	Фон 4 + ассоциация №6	13,2 12,9	13,8 13,9	14,1 13,8
Фон 3 + ассоциация №23	12,6 12,4	14,1 14,6	15,5 15,6	Фон 4 + ассоциация №23	13,5 13,1	13,7 13,9	14,8 15,4
Фон 3 + ассоциация №25	12,3 12,0	14,6 14,8	15,0 15,5	Фон 4 + ассоциация №25	13,3 12,9	13,4 13,5	14,3 15,1
HCP ₀₅ ^A 0,2/0,3		HCP ₀₅ ^B 0,4/0,5		HCP ₀₅ ^C 0,3/0,3			

препятствующих накоплению тяжелых металлов в органах растений [23]. Предполагается, что корни выполняют функцию регулятора поступления тяжелых металлов в надземную часть растений за счет содержащихся в них металлотионинов, связывающих Cd, Zn, Hg, Си, Ag [6]. По данным Ю.В. Алексеева [1], Cd может накапливаться в относительно больших количествах в генеративных органах. Известно, однако, что в зерновых культурах большая часть Cd сосредоточена в корнях, меньшая в зерне [16].

Концентрация Cd в зерне менялась пропорционально содержанию элемента в почве (табл. 3). Инокуляция семян и уровень минерального питания растений также влияли на накопление элемента в зерне. Так, в контроле внесение Cd в дозе 1,0 мг/кг почвы способствовало увеличению данного показателя в 7,7-6,7 раза на фоне оптимальной и полуторной дозы фосфора. При максимальной дозе Cd содержание его в зерне пшеницы повышалось в 18,7—16,7 раза.

В вариантах с инокуляцией при внесении Cd в дозе 1,0 мг/кг почвы содержание его в зерне пшеницы было выше в среднем в 7,3 раза на фоне оптимального уровня и в 6,7 раза при полуторной дозе фосфорного питания. Повышенная доза металла увеличила его накопление в 11,6-11,7 раза соот-

ветственно. Наименьшей аккумуляцией Cd характеризовались варианты с инокуляцией семян ассоциацией №23. Во всех вариантах содержание Cd было несколько ниже по сравнению с аналогичными вариантами контроля и с инокуляцией ассоциациями №6 и 25.

Во 2-й год наблюдалась те же закономерности аккумуляции Cd в зерне, как и в 2000 г. Однако содержание Cd было ниже, чем в опытах прямого действия.

Оценку уровня загрязнения зерна яровой пшеницы Cd проводили на основании утвержденных ПДК для продовольственного сырья и пищевых продуктов (1986) и МДУ для кормов (1987). Следует подчеркнуть, что содержание Cd при дозах внесения 1,0—2,0 мг/кг почвы в зерне пшеницы во всех вариантах опытов в оба года превышало ПДК данного металла. Таким образом, гигиенически безопасной продукции не было получено, однако инокуляция семян пшеницы бактериальными ассоциациями все же значительно снизила поступление данного элемента. Превышение МДУ отмечалось при внесении максимальной дозы Cd в контроле по обоим фонам и в варианте с инокуляцией ассоциацией №25 на фоне оптимального фосфорного питания растений в оба года.

Таблица 3

Аккумуляция Cd в зерне яровой пшеницы, мг/кг

Вариант	Доза Cd, мг/кг почвы			Вариант	Доза Cd, мг/кг почвы		
	0	1,0	2,0		0	1,0	2,0
N ₁ P ₁ K ₁ — фон 1 (контроль)	0,03 0,01	0,23 0,22	0,56 0,45	N ₁ P _{1,5} K ₁ — фон 2 (контроль)	0,03 0,01	0,20 0,19	0,50 0,37
Фон 3 + ассоциация №6	0,02 0,01	0,16 0,16	0,27 0,23	Фон 4 + ассоциация №6	0,02 0,01	0,14 0,11	0,24 0,16
Фон 3 + ассоциация №23	0,02 0,02	0,14 0,13	0,20 0,18	Фон 4 + ассоциация №23	0,02 0,01	0,12 0,11	0,17 0,14
Фон 3 + ассоциация №25	0,03 0,01	0,21 0,19	0,34 0,30	Фон 4 + ассоциация №25	0,02 0,01	0,14 0,13	0,29 0,20
HCP_{05}^A 0,2/0,3		HCP_{05}^B 0,1/0,3		HCP_{05}^C 0,2/0,1			

Выводы

1. Инокуляция семян бактериальными ассоциациями №6, 23 и 25 из ризоценозов *Sesbania sp.* положительно влияла на урожай и качество зерна яровой пшеницы. Наибольшую результативность проявила ассоциация №23, обеспечившая прибавку урожая в среднем за два года на 10,8-11,2% при оптимальной и полуторной дозе фосфора соответственно, прирост сырого протеина — на 0,8% по обоим фонам (относительно контроля).

2. При внесении Cd в зависимости от доз (1,0—2,0 мг/кг почвы) урожай зерна пшеницы в контроле (без инокуляции) в среднем по обоим фонам снижался на 8,5—14,1% в 2000 г. и на 6,5-9,3% в 2001 г. Инокуляция семян пшеницы ассоциациями способствовала снижению фитотоксичности металла. Наибольшим детоксикационным эффектом характеризовалась ассоциация №23.

3. Выявлена стимуляция синтеза азотистых веществ в зерне при использовании Cd в изучаемых концентрациях, при этом содержание сырого протеина во всех вариантах с инокуляцией семян было выше аналогичных в контроле. В зависимости от доз Cd превышение составило в среднем по обоим фондам 0,7~0,9% в 2000 г. и 1,6-1,9% в 2001 г.

4. Содержание Cd в зерне при внесении в дозах 1,0-2,0 мг/кг в оба года превышало ПДК, хотя инокуляция семян бактериальными ассоциациями значительно снизила поступление данного элемента, гигиенически безопасной продукции все же не было получено. Наименьшее содержание металла в оба года выявлено в вариантах с ассоциацией №23. Аккумуляция Cd в зерне в зависимости от доз была ниже контроля по обоим фондам в среднем на 39,6-65,2% в 2000 г. и на 41,5-61,1% в 2001 г.

Библиографический список

1. Алексеев Ю.В. Тяжелые металлы в почвах и растениях. JL: Агропромиздат ЛО, 1987.
2. Временный максимально допустимый уровень (МДУ) содержания некоторых химических элементов и госспола в кормах для сельскохозяйственных животных и кормовых добавках. М., 1987.
3. Гузев В.С., Левин С.В. Техногенные изменения сообщества почвенных микробиорганизмов / Сб.: Перспективы развития почвенной биологии. М.: МАКС Пресс, 2001. С. 178-219.
4. Завалин А.А. Оценка эффективности микробных препаратов в земледелии. М.: РАСХН, 2000.
5. Злотников А.К., Глаголева О.Б., Умаров М.М. Взаимосвязь нитрогеназной активности, устойчивости и относительного содержания компонентов смешанных культур диазотрофных бактерий // Микробиология, 1997. Т. 66. № 6. С. 807—812.
6. Кабата-Пендас А., Пендас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989.
7. Кожемяков А.П. Эффективность и основные функции симбиотических и ассоциативных бактерий — инокулянтов сельскохозяйственных культур // Сельскохозяйственная микробиология в XIX — XXI веках. Тез. докл. Всероссийской конф., Санкт-Петербург, 14—19 июня 2001. С.-Пб, 2001. С. 25—26.
8. Овчаренко М.М. Тяжелые металлы в системе почва — растение — удобрение. М., 1997.
9. Ориентировочно-допустимые концентрации (ОДК) тяжелых металлов и мышьяка в почвах (дополнение №1 к перечню ПДК и ОДК №6229-91): Гигиенические нормативы. М.: Информационно-издательский центр Госкомсанэпиднадзора России, 1995.
10. Панкратова Е.М., Зяблых Р.Ю., Ковина А.Л., Трефилова Л.В. и др. Исследование формирования и эффективности в агробиотехнологии цианобактериальных

- консорциумов: В сб. 60 лет высшему аграрному образованию Северо-востока Нечерноземья. Матер. I Всерос. науч.-практ. конф. Киров, 2004. С. 151 — 156.
11. *Пархоменко Н.А.* Агроэкологическая оценка действия тяжелых металлов в системе почва — растение: Автореф. канд. дис. Омск, 2004.
 12. *Попова А.А.* Влияние минеральных и органических удобрений на состояние тяжелых металлов в почвах // Агрохимия, 1991. №3. С. 62—67.
 13. Предельно допустимые концентрации тяжелых металлов в продовольственном сырье и пищевых продуктах. М.: Минздрав СССР, 1986.
 14. *Раскатов А.В.* Агроэкологические аспекты транслокации тяжелых металлов в почве и растениях: Автореф. канд. дис. М., 2000.
 15. *Рыбальский Н.Г.,Лях С.П.* Экобиотехнологический потенциал консорциумов микроорганизмов. М.: ВНИИПИ, 1990. Т. 1.
 16. *Соколов О.А., Черников В.А.* Экологическая безопасность и устойчивое развитие. Книга 1. Атлас распределения тяжелых металлов в объектах окружающей среды. Пущино, ОНТИ ПНЦ РАН, 1999.
 17. *Степанок В.В.* Влияние соединений кадмия на урожай и элементный состав сельскохозяйственных культур // Агрохимия, 1998. № 6. С. 74—79.
 18. *Умаров М.М.* Ассоциативная азотфиксация. М.: МГУ, 1986.
 19. *Черных Н.А.* Изменение содержания ряда химических элементов в растениях под действием различных количеств тяжелых металлов в почве // Агрохимия, 1991. №3. С. 68-76.
 20. *Черных Н.А., Милащенко Н.З., Ладонин В.Ф.* Экотоксикологические аспекты загрязнения почв тяжелыми металлами. М.: Агроконсалт, 1999.
 21. *Шабаев В.П.* Роль биологического азота в системе «почва — растение» при внедрении ризосферных микроорганизмов. Автореф. докт. дис. М., 2004.
 22. *Шильникова В.К., Годова Г.В., Карепина Т.А.* Перспективные микробиологические технологии получения экологически чистой продукции овощей // Тез. докл. научно-практ. конференции «Дисбактериозы и эубиотики», посвященной 100-летию основания МНИИ ЭМ имени Г.Н. Габричевского, 12—15 марта. М., 1998. С. 43—45.
 23. *Юдкин Л.Ю., Степанок В.В.* Роль ассоциативных ризосферных бактерий в устойчивости растений в условиях загрязнения экосистем тяжелыми металлами // Сельскохозяйственная микробиология в XIX — XXI веках. Тез. докл. Всероссийской конф., Санкт-Петербург, 14—19 июня 2001. С.Пт., 2001. С. 83—84.
 24. *Holguin G., Guzman M.A., Bashan Y.* Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees // FEMS Microbiol. Ecol. 1992. V. 101(3). P. 207-216.
 25. *Khammas K.M., Kaiser P.* Associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* sp. // Can. J Microbiol., 1992. V. 38. P. 794-797.

SUMMARY

Results about research into seeds inoculation with rhizocenosis associations of wild tropical variety *Sesbania* sp. influence on both crop-producing power and grain quality in soil with higher Cd content are provided in the article. Ability of bacterial associations to reduce phytotoxicity of cadmium when they are introduced into rhizosphere has been discovered.

Key words: inoculation, bacterial associations, cadmium (Cd), wheat.

Назарова Татьяна Михайловна — к. б. н. Тел. (495) 976-09-66.

Сидоренкова Надежда Константиновна — к. б. н.

Волобуева Валентина Федоровна — к. б. н.

Шильникова Викторина Кузьминична — д. б. н.